

- 2) 伊藤佐生智, 小代智紀, 工藤早苗, 川野久美, 米谷芳枝, 辻勉: 硫酸化シアル酸誘導体NMSO3によるP-セレクチン依存的な細胞接着の制御とDDSへの応用. 第15回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (2014. 5. 23-24, 名古屋).
- 3) 築地信, 雨宮美穂, 小倉若菜, 矢島義正, 河合琴美, 安藤祐介, 奥輝明, 長坂淳子, 辻勉: 黒穂菌菌糸体の免疫応答調節作用の解析. 第15回Pharmaco-Hematologyシンポジウム (2014. 5. 23-24, 名古屋).
- 4) Oku T, Kaneko Y, Ishii R, Toyoshima S, Tsuji T: Thr-412 of human coronin-1 is phosphorylated by protein kinase C. 第87回日本生化学会大会 (2014. 10. 15-18, 京都).

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

図1 細胞からのサイトカイン放出

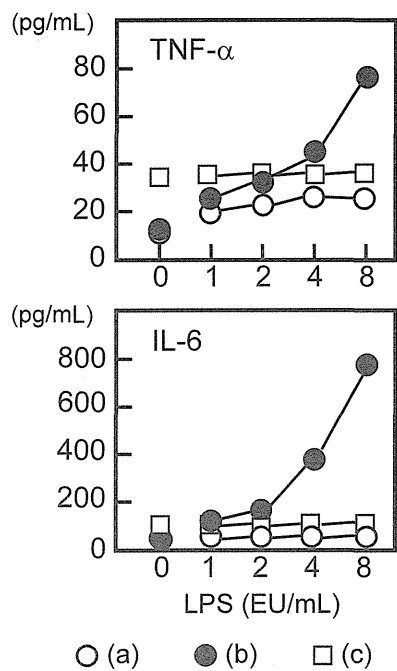


表1 サイトカイン産生に及ぼす血清の影響

LPS (EU/mL)	TNF-α	
	血清存在下	無血清
-	35	39
1	2100	52
2	2072	86
4	1871	116
8	1918	188

学会等発表実績 (I)  
委託業務題目「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」  
(「医薬品品質管理手法の高度化に対応した機能性医薬品製剤の評価技術の開発」)

機関名：国立医薬品食品衛生研究所，東京大学大学院，東京工業大学，興和株式会社，東邦大学，千葉大学大学院，塩野義製薬株式会社  
第一三共株式会社，武田薬品工業株式会社，星薬科大学，キュービー株式会社，テラ株式会社，株式会社IHI，

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所	発表した時期	国内・外の別
		（学会等名）		
肝臓のトランスポーターについて.	楠原洋之， 前田和哉	東京 (第31回日本TDM学会・学術大会)	2014年5月	国内
がんの診断・治療のための高分子ミセル型DDSの開発	西山伸宏	仙台 (日本病院薬剤師会東北ブロック第4回学術大会)	2014年5月	国内
Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy	Nishiyama, N.	Korea (Emerging Biomaterials)	2014年5月	国外
物理化学的評価に基づいたdrug-drug co-amorphousの構造安定性に関する研究	植田 廣，佐久間聡，井田泰夫，村主教行，阿曾幸男	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
GastroPlus を用いた吸入剤の薬物動態予測に関する検討（ポスター）	吉田寛幸，伊豆津健一，四方田千佳子，柴田寛子，合田幸広	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
経肺吸収剤の評価法（口頭）	吉田寛幸	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
リポソームと相互作用する生体分子の探索とその評価	柴田寛子，四方田千佳子，吉田寛幸，伊豆津健一，川西徹，奥田晴宏，合田幸広	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
リポ化製剤の血中薬物放出挙動のin vitro評価	天野陽平，吉田拓史，金光智行	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
難溶性原薬の脱塩・フリー化に関する研究	大島大樹，長田裕臣，山田裕之	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
リポ化製剤の血中薬物放出挙動のin vitro評価	天野陽平	さいたま (日本薬剤学会第29年会)	2014年5月	国内
Biological functionalities of polymeric micelle systems for targeting cancer	Nishiyama, N.	Basel, Switzerland (The European Summit for Clinical Nanomedicine 2014 (6th CLINAM 2014))	2014年6月	国外
高分子ナノテクノロジーを基盤とするナノ医薬品の開発	西山伸宏	東京 (第10回つくばがん遺伝子治療研究会)	2014年6月	国内
リポソーム製剤の評価について	加藤くみ子	京都 (第32回物性物理化学研究会)	2014年6月	国内
NMRによる定量分析技術“AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)”の日本薬局方試薬への応用	末松孝子，細江潤子，杉本直樹，三浦亨，山田裕子，早川昌子，鈴木裕樹，勝原孝雄，西村浩昭，菊地祐一，山下忠俊，合田幸広	東京 (プロセス化学会2014サマーシンポジウム)	2014年7月	国内
Amorphous/amorphous phase separation of solutes in frozen solutions: implication for pharmaceutical lyophilization	Izutsu, K., Shibata, H., Yoshida, H., Goda, Y.	Cambridge, England (Amorph 2014 Symposium)	2014年7月	
Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Delivery of Cisplatin	Andang Miatmoko, 川野久美，服部喜之，米持悦生	東京 (第30回日本DDS学会学術集会)	2014年7月	国内
カチオン性リポソーム構成成分の細胞内動態に関する研究	加藤くみ子，運敬太，合田幸広	東京 (第30回日本DDS学会学術集会)	2014年7月	国内
高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発，新製剤技術とエンジニアリングを考える会	西山伸宏	京都 (第12回技術講演会)	2014年7月	国内
Application of AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance) to the reagents in the crude drug section of the Japanese Pharmacopoeia	Suematsu, T., Hosoe, J., Sugimoto, N., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T., Goda, Y.	Fukuoka, Japan (The 8th JSP-CCTCN-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy)	2014年9月	国内 (国際学会)
オゾン促進酸化殺菌における気相中のOHラジカルの測定法	高橋克巳，山村隼志，斉藤麻紀子，伊澤淳，濱野靖徳	東京 (日本防菌防黴学会第41回年次大会)	2014年9月	国内
The preparation of Hybrid Nanoparticles Composed of Polyethylene Oxide-b-Polymethacrylic Acid (PEO-b-PMAA) for Loading Anticancer Drugs	Miatmoko, A., Kawano, K., Hattori, Y., Yonemochi, E.	東京 (第58回日本薬学会関東支部大会)	2014年10月	国内

AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)による天然由来成分の純度評価のための基礎研究	末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 山田裕子, 三浦亨, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩昭, 菊池祐一, 山下忠俊, 合田幸広	高知 (天然有機化合物討論会)	2014年10月	国内
Evaluation of fluid flow profile in flow-through dissolution cells using particle image velocimetry	Yoshida, H., Shibata, H., Izutsu, K, Goda, Y.	Seoul, Korea (FIP BABE symposium)	2014年10月	国外
HPMC及びPVPの薬物結晶化抑制機構の違いが膜透過性に及ぼす影響	大塚直哉, 植田圭祐, 清水梢, 片川和明, 熊本卓哉, 東頭二郎, 山本恵司, 森部久仁一	名古屋 (製剤機械技術学会第24回大会)	2014年10月	国内
AFMを用いた懸濁液中における3成分ナノ粒子凝集過程の評価	江上貴一, 東頭二郎, 山本恵司, 森部久仁一	福岡 (第31回製剤と粒子設計シンポジウム)	2014年10月	国内
過飽和溶液からの結晶化挙動に及ぼすNaringenin光学純度の影響	植田圭祐, 東頭二郎, 森部久仁一	福岡 (第31回製剤と粒子設計シンポジウム)	2014年10月	国内
生体イメージングを活用したナノDDS設計, 3S05a疾患克服を目指したケミカルバイオフォトニクス技術	西山伸宏, (2014.10).	京都 (第87回日本生化学会大会)	2014年10月	国内
Physical properties and stability of co-amorphous nifedipine- nicotinamide	Miyazaki, T., Aso, Y., Goda, Y.	San Diego, USA (2014 AAPS Annual Meeting)	2014年11月	国外
Component Miscibility and Protein Stability in Freeze-Dried Formulations	Izutsu, K.	San Diego, USA (2014 AAPS Annual Meeting)	2014年11月	国外
Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines	Goda, Y.	Hong Kong (2014 International Summit on Innovative Drug Discovery, Charting the Course of Standardization of Chinese Materia Medica)	2014年11月	国外
物理化学的パラメータに基づいたCo-amorphousの安定性評価	上田廣	三島 (PhysChem Forum Japan 2nd Symposium)	2014年12月	国内
肝異物排泄におけるトランスポーターの個人間変動とPETを用いたin vivo輸送能力の評価	楠原洋之	松山 (第35回日本臨床薬理学会学術集会)	2014年12月	国内
Effect of phenytoin/EUDRAGIT® S 100 miscibility in solid dispersion on drug and polymer dissolution rates	Higashi, K., Hayashi, H., Yamamoto, K., Moribe, K.	Bangkok, Thailand (Pharm Tech2014)	2014年12月	国外
コアモルファスニフェジピン-アセトアミノフェンの結晶化速度と分子運動性の関連	阿曾幸男, 宮崎玉樹, 合田幸広	神戸 (日本薬学会第135年会)	2015年3月	国内
HPMC-ASの薬物結晶化抑制作用に及ぼす胆汁酸及び脂質の影響	植田圭祐, 東頭二郎, 片岡誠, 山下伸二, 山本恵司, 森部久仁一	神戸 (日本薬学会第135年会)	2015年3月	国内

## 2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文 (発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
The effect of HPMCAS functional groups on drug crystallization from the supersaturated state and dissolution improvement	Ueda, K., Higashi, K., Yamamoto, K., Moribe, K.	International Journal of Pharmaceutics, 464 (1-2):205-213	2014	国外
Encapsulation of poorly water-soluble drugs into organic nanotubes for improving drug dissolution	Moribe, K., Makishima, T., Higashi, K., Nan L., Limwikrant, W., Ding, W., Masuda, M., Shimizu, T., Yamamoto, K.	International Journal of Pharmaceutics, 469:190-196	2014	国外
Inhibition mechanism of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug crystallization in gastrointestinal fluid and drug permeability from a supersaturated solution	Ueda, K., Higashi, K., Kataoka, M., Yamashita, S., Yamamoto, K., Moribe, K.	European Journal of Pharmaceutical Sciences, 62: 293-300	2014	国外
Studying the Morphology of Lyophilized Protein Solids using X-Ray Micro CT: Effect of Post-freeze Annealing and Controlled Nucleation	Izutsu, K., Yonemochi, E., Yomota, C., Goda, Y, Okuda, H.	AAPS PharmSciTech, 15:1181-1188	2014	国外
Effects of Formulation and Process Factors on the Crystal Structure of Freeze-dried Myo-Inositol	Izutsu, K., Yomota, C., Okuda, H., Kawanishi, T., Yamaki, T., Ohdate, R., Yu, Z., Yonemochi, E., Terada, K.	J. Pharm. Sci., 103:2347-2355	2014	国外

直腸投与製剤の種類と用途	柴田寛子, 伊豆津健一	薬局, 65: 2365-2369	2014	国内
経肺吸収製剤の評価法に係る規制の現状について	吉田寛幸	医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45:891-897	2014	国内
In vivo siRNA delivery system for targeting to the liver by poly-L-glutamic acid-coated lipoplex	Hattori, Y., Nakamura, A., Arai, S., Nishigaki, M., Ohkura, H., Kawano, K., Maitani, Y., Yonemochi, E.	Results in Pharma Sciences, 4:1-7	2014	国外
Sequential intravenous injection of anionic polymer and cationic lipoplex of siRNA could effectively deliver siRNA to the liver	Hattori, Y., Arai, S., Okamoto, R., Hamada, M., Kawano, K., Yonemochi, E.	Int. J. Pharm., 476:289-298	2014	国外
日本薬局方における品質試験と製造工程管理: プロセス解析工学 (PAT) と新たな品質パラダイム	香取典子, 坂本知昭, 小出達夫	レギュラトリーサイエンス学会誌, 4(2):177-187	2014	国内
Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled in vivo chemotherapy	Yen HC, Cabral H, Mi P, Toh K, Matsumoto Y, Liu X, Koori H, Kim A, Miyazaki K, Miura Y, Nishiyama N, Kataoka K.	ACS Nano 8:11591-11602	2014	国外
Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles	Kim, H.J., Takemoto, H., Yi, Y., Zheng, M., Maeda, Y., Chaya, H., Hayashi, K., Mi, P., Pittella, F., Christie, R.J., Toh, K., Matsumoto, Y., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.	ACS Nano 8:8979-8991	2014	国外
Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation	Wu, H., Cabral, H., Toh, K., Mi, P., Chen, Y.C., Matsumoto, Y., Yamada, N., Liu, X., Kinoh, H., Miura, Y., Kano, M.R., Nishihara, H., Nishiyama, N., Kataoka, K.	J. Control. Release 189:1-10	2014	国外
Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection	Uchida, H., Itaka, K., Nomoto, T., Ishii, T., Suma, T., Ikegami, M., Miyata, K., Oba, M., Nishiyama, N., Kataoka, K.	J. Am. Chem. Soc. 136(35):12396-12405	2014	国外
Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors	Oe, Y., Christie, R.J., Naito, M., Low, S.A., Fukushima, S., Toh, K., Miura, Y., Matsumoto, Y., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.	Biomaterials 35(27):7887-7895	2014	国外
Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy	Quader, S., Cabral, H., Mochida, Y., Ishii, T., Liu, X., Toh, K., Kinoh, H., Miura, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K.	J. Control. Release, 188:67-77	2014	国外
Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor	Mochida, Y., Cabral, H., Miura, Y., Albertini, F., Fukushima, S., Osada, K., Nishiyama, N., Kataoka, K.	ACS Nano 8(7):6724-6738	2014	国外
Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. Macromol	Maeda, Y., Pittella, F., Nomoto, T., Takemoto, H., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.	Rapid Commun. 35(13):1211-1215	2014	国外
Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum	Nuhn, L., Gietzen, S., Mohr, K., Fischer, K., Toh, K., Miyata, K., Matsumoto, Y., Kataoka, K., Schmidt, M., Zentel, R.	Biomacromolecules 15(4):1526-1533	2014	国外
siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core	Kim, H.J., Miyata, K., Nomoto, T., Zheng, M., Kim, A., Liu, X., Cabral, H., Christie, R.J., Nishiyama, N., Kataoka, K.	Biomaterials 35(15):4548-4556	2014	国外
Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer	Nomoto, T., Fukushima, S., Kumagai, M., Machitani, K., Arnida, Matsumoto, Y., Oba, M., Miyata, K., Osada, K., Nishiyama, N., Kataoka, K.	Nat. Commun. 5: 3545	2014	国外
Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles	Pittella, F., Cabral, H., Maeda, Y., Mi, P., Watanabe, S., Takemoto, H., Kim, H.J., Nishiyama, N., Miyata, K., Kataoka, K.	J. Control. Release 178:18-24	2014	国外

Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components	Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuohara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H.	Biomaterials 35:1347-1358	2014	国外
Sensitive method for measuring the concentration of doxorubicin and its metabolites in biological samples	Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, H.	Chromatogr., 35(suppl2):81	2014	国外
Development of liposomal nanoconstructs targeting P-selectin (CD62P)-expressing cells by using a sulfated derivative of sialic acid	Itoh, S., Kawano, K., Takeshita, K., Maitani, Y., Tsuji, T.	Pharm. Res., 31:2868-2875	2014	国外
Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5)	Kamoshida, G., Ogawa, T., Oyanagi, J., Sato, H., Komiya, E., Higashi, S., Miyazaki, K., Tsuji, T.	Clin. Exp. Metastasis, 31:285-291	2014	国外
Prognostic factors related to add-on dendritic cell vaccines on patients with inoperable pancreatic cancer receiving chemotherapy: a multicenter analysis	Kobayashi, M., Shimodaira, S., Nagai, K., Ogasawara, M., Takahashi, H., Abe, H., Tani, M., Okamoto, M., Tsujitani, S., Yusa, S., Ishida, T., Kishimoto, J., Shibamoto, Y., Nagaya, M., Yonemitsu, Y.	Cancer Immunol Immunother., 63:797-806	2014	国外
Immunogenic modulation of cholangiocarcinoma cells by chemoimmunotherapy	Koido, S., Kan, S., Yoshida, K., Yoshizaki, S., Takakura, K., Namiki, Y., Tsukinaga, S., Odahara, S., Kajihara, M., Okamoto, M., Ito, M., Yusa, S., Gong, J., Sugiyama, H., Ohkusa, T., Homma, S., Tajiri, H.	Anticancer Res., 34:6353-6361	2014	国外
Treatment with Chemotherapy and Dendritic Cells Pulsed with Multiple Wilms' Tumor 1 (WT1)-Specific MHC Class I/II-Restricted Epitopes for Pancreatic Cancer	Koido, S., Homma, S., Okamoto, M., Takakura, K., Mori, M., Yoshizaki, S., Tsukinaga, S., Odahara, S., Koyama, S., Imazu, H., Uchiyama, K., Kajihara, M., Arakawa, H., Misawa, T., Toyama, Y., Yanagisawa, S., Ikegami, M., Kan, S., Hayashi, K., Komita, H., Kamata, Y., Ito, M., Ishida, T., Yusa, S., Shimodaira, S., Gong, J., Sugiyama, H., Ohkusa, T., Tajiri, H.	Clin. Cancer Res., 20:4228-4239	2014	国外
siRNA delivery into tumor cells by cationic cholesterol derivative-based nanoparticles and liposomes	Hattori, Y., Hara, E., Shingu, Y., Minamiguchi, D., Nakamura, A., Arai, S., Ohno, H., Kawano, K., Fujii, N., Yonemochi, E.	Biol. Pharm. Bull., 38:30-38	2015	国内 (英文誌)
Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer	Ahn, J., Miura, Y., Yamada, N., Chida, T., Liu, X., Kim, A., Sato, R., Tsumura, R., Koga, Y., Yasunaga, M., Nishiyama, N., Matsumura, Y., Cabral, H., Kataoka, K.	Biomaterials 39:23-30	2015	国外
Investigation of factors affecting in vitro doxorubicin release from PEGylated liposomal doxorubicin for the development of in vitro release testing conditions	Shibata, H., Izutsu, K., Yamota, C., Okuda, H., Goda, Y.	Drug Dev. Ind. Pharm. on line available (DOI 10.3109/03639045.2014.954582)	2015	国外



201433009A (2/4)

厚生労働科学研究委託費

創薬基盤推進研究事業

医薬品等の品質・安全性確保のための  
評価法の戦略的開発

平成26年度 委託業務成果報告書 (第2分冊)

先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発

(H26 - 創薬 - 一般 - 009)

受託者 (研究代表者) 合田 幸広

平成27 (2015) 年3月



本報告書は、厚生労働省の創薬基盤推進研究事業による委託業務として、合田 幸広が実施した平成26年度「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

## I. 総括研究報告書

先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発 川崎 ナナ	1
---------------------------------------	---

## II. 分担研究報告書

先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発 川崎 ナナ	33
質量分析を用いたバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発 橋井 則貴	41
バイオ医薬品の品質安全性評価法の開発と標準化 石井 明子	51
バイオ医薬品の化学修飾と機能評価に関する研究 山口 秀人	61
バイオ医薬品の品質試験に関する研究方法 中家 修一	89
バイオ医薬品の品質試験におけるシステム適合性に関する研究 奥村 渉	103
バイオ医薬品の品質評価法について 鳥巢 哲生	109
生物活性試験法の開発及び標準化 古賀 淳一	117
バイオ医薬品の品質試験におけるシステム適合性に関する研究 寺島 勇	133

バイオ医薬品の糖鎖試験法に関する研究 水野 保子	139
バイオ医薬品の糖鎖・不純物の評価法について 横山 毅	147
TGカイコ繭生産タンパク質における不純物の評価に関する研究 富田 正浩	155
バイオ医薬品の凝集体分析法に関する検討 大庭 澄明	161
特性に応じた凝集体の評価手法の開発と標準化 内山 進	177
免疫原性評価法標準化に向けての科学的根拠に基づく評価技術の開発 秦 信子	183
バイオ医薬品の血中濃度測定技術に関する研究 菊池 慶実	185
LC/MSによるバイオ医薬品の血中濃度測定技術の開発 南出 善幸	187
リガンド結合法によるバイオ医薬品の免疫原性評価法について 中村 隆広	191
液体クロマトグラフィー／質量分析 (LC/MS) 又はリガンド結合法 (Ligand Binding Assay) によるバイオ医薬品の評価法の開発 井上 則子	195
リガンド結合法によるバイオ医薬品の免疫原性評価法の開発と標準化 橋本 勉	213
バイオ医薬品の安全性の分析・評価法研究 豊島 聰	229

トランスジェニック動物（カイコ）による先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための研究 瀬筒 秀樹	.....243
組換えカイコによるリソソーム病治療薬の開発 伊藤 孝司	.....251
トランスジェニックカイコを用いたバイオ医薬品の生産 武田 茂樹	.....259
バイオ医薬品の新規ウイルス安全性評価系の開発 遊佐 敬介	.....265
バイオ工程評価におけるウイルス・ウイルス様粒子の解析と測定法の開発 坂井 薫	.....273
<b>Ⅲ. 学会等発表実績</b>	
様式第 19 学会等発表実績（2）	.....277

研究課題 先端的生物医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発

研究分担者 川崎ナナ 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

要旨 先端的生物医薬品の品質・安全性確保における優先課題：1.品質（翻訳後修飾，不純物等の解析・管理手法），2.新規宿主細胞等の安全性及び管理手法，3.血中薬物濃度分析法，4.抗薬物抗体分析法，5.臨床安全性，6.ウイルス安全性 について，先端技術を応用した評価法の開発と標準化を目指した研究を行い，以下の成果を得た．

1. 品質：(1) O-結合型糖鎖試験法の標準化を目的に，非還元アルカリβ-脱離法の最適化を行った．(2) 光遮蔽法を含む6種類の凝集体評価法について，粒子径標準粒子を試料とした分析能の比較を行い，各評価法の特徴を明らかにした．(3) バイオ医薬品注射剤の不溶性微粒子試験法に関し，試験の低容量化に必要な課題を明らかにした．
2. 新規宿主細胞：カイコ繭タンパク質を定量するためのELISAを構築し，トランスジェニック（Tg）カイコ由来バイオ医薬品の不純物評価法としての有用性を明らかにした．Tgカイコ卵巣及び精巣の採取・凍結・再移植技術を開発し，Tgバンク凍結保存の運用試験を開始した．
3. 薬物濃度：抗体医薬品を対象とした血中濃度薬物分析において，前処理等の違いが分析法バリデーション結果に及ぼす影響を多機関共同研究により検証した．
4. 抗薬物抗体：LOCI法あるいはECL法を用いた抗薬物抗体分析において，共存薬物による妨害の回避のために有用な前処理方法を見出した．また，WHOが主催する抗薬物抗体国際標準品の共同検定に参加した．
5. 安全性：医薬品副作用データベースに登録された抗体医薬品に関する有害事象を解析し，インフリキシマブでは30代または乾癬，セツキシマブ及びリツキシマブでは60代以上がinfusion reactionのリスク因子である等の可能性を見出した．
6. ウイルス：CHO細胞が産生する内在性レトロウイルス様粒子の遺伝子がChERV-050801であることを明らかにした．Q-PCRを用いたウイルス試験において，残存するウイルスゲノム断片をnucleaseで分解することによって，ウイルス感染価との相関性を確保できることを明らかにした．

研究分担者：(所属 50 音順)

秦 信子 (株)Ig-M 研究開発部  
菊池慶実 味の素(株)バイオ・ファイン研究所  
山口秀人 アステラス製薬(株)バイオ技術研究所  
橋本 勉 (株)LSI メディエンス 創薬支援事業本部  
武田茂樹 群馬大学大学院理工学研究府  
石井明子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
橋井則貴 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
遊佐敬介 国立医薬品食品衛生研究所  
再生・細胞医療製品部  
井上則子 (株)JCL バイオアッセイ 研究部  
中家修一 (株)島津製作所 分析計測事業部  
南出善幸 (株)島津テクニロジー  
医薬ライフサイエンス事業部  
中村隆広 (株)新日本科学 安全性研究所  
奥村 渉 (株)住化分析センター  
ファーマ大阪事業所  
古賀淳一 第一三共(株)研究開発本部  
鳥巢哲生 武田薬品工業(株)CMC 研究センター  
光バイオ技術室  
寺島 勇 中外製薬(株)CMC 開発部(分析技術)  
水野保子 (株)東レリサーチセンター  
医薬信頼性保証室  
伊藤孝司 徳島大学大学院  
ヘルスバイオサイエンス研究部  
坂井 薫 (一社)日本血液製剤機構中央研究所  
横山 毅 (一社)日本血液製剤機構 中央研究所  
瀬筒秀樹 (独)農業生物資源研究所  
豊島 聰 武蔵野大学薬学部・大学院薬科学研究科  
富田正浩 (株)免疫生物研究所  
遺伝子組換えカイコ事業部  
大庭澄明 持田製薬(株)製剤研究所  
内山 進 (株)ユー・メディコ

研究協力者：(所属 50 音順, 氏名 50 音順)

伊賀朋世 (株)Ig-M 研究開発部研究員  
鳥澤亜矢 (株)Ig-M 研究開発部研究員  
板屋 寛 味の素(株)製薬カスタムサービス部  
山田尚之 味の素(株)イノベーション研究所  
熊谷 崇 アステラス製薬(株)バイオ技術研究所

古木健一朗 アステラス製薬(株)バイオ技術研究所  
武藤 峻 アステラス製薬(株)バイオ技術研究所  
星野雅輝 (株)LSI メディエンス 医薬品分析部  
森 民樹 (株)LSI メディエンス  
メディカルソリューション本部  
中野祥晃 (一財)化学及血清療法研究所品質管理部  
柳原繁弘 協和発酵キリン(株)  
生産本部バイオ生産技術研究所  
多田 稔 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
小林 哲 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
原園 景 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
太田悠葵 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
高久明美 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
西村和子 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部  
立花克彦 JCR ファーマ(株)研究本部  
後藤理恵子 (株)JCL バイオアッセイ  
西脇ラボ化学分析部門  
笹原里美 (株)JCL バイオアッセイ  
大阪ラボ化学分析部門  
繁水裕子 (株)JCL バイオアッセイ  
大阪ラボ化学分析部門  
洲本高志 (株)島津製作所 分析計測事業部  
十時慎一郎 (株)島津製作所 分析計測事業部  
前田裕貴 (株)島津製作所 分析計測事業部  
丸山 充 (株)島津製作所 分析計測事業部  
鷺尾一裕 (株)島津製作所 分析計測事業部  
野村達希 (株)新日本科学 安全性研究所  
横田喜信 (株)新日本科学 安全性研究所  
山口 建 (株)住化分析センター 医薬事業本部  
尾島琢磨 第一三共(株)バイオ医薬研究所  
小林直樹 第一三共(株)バイオ医薬研究所  
塩入優紀 第一三共(株)バイオ医薬研究所  
中子真由美 大日本住友製薬(株)  
技術研究本部分析研究所  
清水久夫 武田薬品工業(株)医薬研究本部  
薬物動態研究所  
神野文宏 武田薬品工業(株)医薬研究本部  
薬物動態研究所  
藤田 央 武田薬品工業(株)医薬研究本部  
薬物動態研究所

齋藤 智 中外製薬(株) CMC 開発部 分析技術  
小川泰一郎 (株)東レリサーチセンター  
名古屋研究部  
森脇有加 (株)東レリサーチセンター  
生物科学研究部  
吉永良介 (株)東レリサーチセンター  
名古屋研究部  
井手野祥次 (一社)日本血液製剤機構 中央研究所  
高橋一恵 (一社)日本血液製剤機構 中央研究所  
手島 澄人 (一社)日本血液製剤機構 中央研究所  
立松謙一郎 (独)農業生物資源研究所  
村山一茂 武蔵野大学薬学部・大学院薬科学研究科  
田中二郎 Meiji Seika ファルマ(株)  
バイオサイエンス研究所  
瀬川辰也 (株)免疫生物研究所  
王 小彪 (株)免疫生物研究所  
小島昌太 持田製薬(株) 製剤研究所  
クラユヒナエレナ (株)ユー・メディコ  
横山雅美 (株)ユー・メディコ

## A.目的

バイオ医薬品は構造が複雑で不均一性があり、生物由来の不純物などが残存している可能性がある。これらの品質特性の中には、その特性が変動することにより、薬物動態や免疫原性などに影響を及ぼし、結果として安全性などに影響を及ぼすものもある。医薬品の開発と製造には、品質及び安全性を評価・試験するための方法が必要であるが、先端的バイオ医薬品においては、評価法・試験法が標準化されていないケースや、既存の標準的方法を利用できないケースがある。医薬品開発企業は、独自に評価法・試験法を開発し、医薬品開発や製造に利用しているが、評価法・試験法の開発や最適化に時間がかかるなどの課題がある。

本研究グループでは、バイオ医薬品開発に必要な評価法・試験法について、国立研究機関及び製薬企業等が共同で、様々な手法の問題点を抽出、改良、検証し、標準的評価法・試験法を策定することを目的に、優先的に取り組むべき課題を設定して、課題解決に向けた研究を行っている。

本年度は、品質関連の課題として、糖鎖試験法と凝集体評価法の標準化、注射剤の不溶性微粒子試験の低容量化、バイオ医薬品品質試験のシステム適合性の設定方法の提案、ならびに、新規基材で製造されるバイオ医薬品の品質評価・管理手法の開発に取り組んだ。また、品質評価と共通性の高い手法が用いられるバイオアナリシスに関して、LCMSによる血中薬物濃度分析法、及び、リガンド結合法による抗薬物抗体 (ADA) 分析法の標準化に向けた検討を行った。さらに、バイオ医薬品の安全性確保に関する研究として、独自に構築した医薬品副作用データベース解析システムを活用した抗体医薬品の有害事象に関するリスク因子の抽出、ならびに、CHO細胞の内在性レトロウイルス遺伝子特定、Q-PCRを用いたウイルス試験の改良を行った。

## B.研究方法

### B.1.品質

#### B.1.1 O-結合型糖鎖試験法の標準化

試料としてFc融合タンパク質 (アバタセプト)、及び、ウシフェツインを用いた。

#### (1)非還元的アルカリβ-脱離

4mg/mLのタンパク質溶液 100μLに 300 mg/mLカルバミン酸アンモニウム溶液 400μLを混合し、60°Cで20時間インキュベートした。精製水 500μLを添加し、60°Cで減圧にて遠心乾固した。本操作をさらに1回繰り返した。150mmol/L酢酸水溶液 500μLを添加して60°Cで減圧にて遠心乾固を2回繰り返した。水 30μLに溶解した。遊離糖鎖を含む溶液全量をBlotGlyco法のプロトコールに従って2AB誘導体化し、70%アセトニトリルを加えて試料溶液とした。10μLをHILIC/FLにより分析した。

#### (2)還元的アルカリβ-脱離

糖タンパク質試料に1M水素化ホウ素ナトリウムを含む0.05Mの水酸化ナトリウム溶液 50μLを加えてよく攪拌した後、40, 60, 80°Cにて、30分間~7時間反応させた。反応後、氷冷した酢酸(3滴)を加えて中和し、水 250μLを加え、活性化した強陽イオン

交換樹脂に通した。この液を減圧にて遠心乾固した。メタノール 500 $\mu$ L を加えて攪拌し減圧にて遠心乾固を 3 回繰り返してボランを除去した後、0.1% トリフルオロ酢酸(50 $\mu$ L)に溶解させ、分析試料とした。0.5 $\mu$ L を MALDI-TOFMS により分析した。

### (3)1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMP) 誘導体化

糖タンパク質試料に、0.5M PMP を含む 25% アンモニア水 100 $\mu$ L を加えてよく攪拌した後、50 $^{\circ}$ C で 15 時間反応させ、減圧にて遠心乾固した。水 500 $\mu$ L を加えて減圧にて遠心乾固を 2 回繰り返した後、1% 酢酸溶液(1mL)とクロロホルム(1mL)を加えて強く攪拌し、クロロホルム層を除く操作を計 4 回繰り返した。水層を減圧にて遠心乾燥し、水 1mL に再溶解し、C18 固相抽出カートリッジで精製した。

## B.1.2 凝集体評価法の標準化

### B.1.2.1 凝集体評価法の分析能の比較

#### B.1.2.1.1 標準粒子希釈液の調製

Thermo Fisher Scientific 社より、NICB トレーサブル粒子径標準粒子 60 nm, 220 nm, 500 nm, 2 $\mu$ m, 5 $\mu$ m 及び 10 $\mu$ m (ポリスチレン) 並びに 1 $\mu$ m (シリコン) を購入した (表 1)。

標準粒子は 0.2 $\mu$ m のフィルターを通したミリ Q 水を用いて希釈し、ポリスチレン粒子は 0.001%, 0.0005%, 0.00025%, 0.0001%, 0.00005% 及び 0.000025% の溶液、シリカ粒子は、0.002%, 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001% 及び 0.00005% の溶液を調製した。希釈液は分注し、共同研究参加機関へ室温にて配布した。濃度範囲が測定に適さない場合は適宜希釈液を調製することとした。粒子径標準粒子の希釈液は、よく混合し、適切な方法で脱気した後、分析に供することとした。測定する標準粒子の粒子径は、各装置の測定可能な粒子径をもとに決定した (表 2)。

#### B.1.2.1.2 標準粒子の分析

##### (1)光遮蔽

KL-04A (リオン) 及び 8000A+3000A (HIACH)

を用いた。日局 <6.07> 注射剤の不溶性微粒子試験法に従い、5mL ずつ 4 画分採取し、粒子径分布を計測した。最初の画分の計測値は棄却し、残りの計測値から平均粒子数を計算した。

##### (2)フローイメージング

DPA-4200 及び PA-4100 (Brightwell), MFI5200 (Protein Simple), Flow CAM (Fluid imaging technologies) 及び FPIA-3000S (Marvern) を用いた。

##### (3)レーザー回折

Aggregates Sizer (島津製作所) を用い、1mm 光路長セルを用いて測定した。

##### (4)動的光散乱

UPA-UT (日機装), ゼータサイザーナノ ZS (Marvern) 及び ELSZ (大塚電子) を用いた。

##### (5)ナノトラッキング

Nanosight NS500 (Marvern) を用いた。

##### (6)共振型質量測定

アルキメデス (Malvern) を用いた。

### B.1.2.2 不溶性微粒子試験の低容量化の検討

標準粒子試料を 0.2, 0.5 または 1 mL ずつ 4 画分採取し、日局 <6.07> 注射剤の不溶性微粒子試験法 (LO) に準じて試験を行い、3 画分の計測値を得た。

### B.1.2.3 過酷試験試料における不溶性微粒子数

抗体溶液製剤 (mAbA) 4 ロットについて、それぞれ 40 $^{\circ}$ C で 4 週間保管し、不溶性微粒子試験法にて不溶性微粒子数を測定した。

## B.1.3 バイオ医薬品品質試験のシステム適合性

共同研究参加機関を対象に、バイオ医薬品品質試験に関して、適切と考えられるシステム適合性に関するアンケート調査を行った。

## B.2. 新規宿主細胞



## B.2.1 カイコ繭由来タンパク質定量法の構築

カイコ繭より 8M 尿素にて抽出したタンパク質を免疫原として家兎に免疫し、採取した抗血清から Protein A カラムにより IgG 画分を精製した。得られた IgG から、Fab'、及び、Fab'-HRP を調製した。抗繭タンパク質 IgG 画分をマイクロプレートに固相化し、Fab'-HRP を検出用試薬として用いる ELISA 系を構築した。作製したカイコ繭由来タンパク質 ELISA にて、Tg カイコ繭から抽出・精製した組換えタンパク質 A の各精製工程における溶液中の残存 HCP を測定した。

## B.2.2 Tg カイコ繭由来タンパク質の試験的製造、発現系改良、及び、バンク化技術の開発

カテプシン A、リソソーム病治療用酵素 X、食欲抑制ペプチド活性型ネスファチン、ガン抗原 MAGE-A4、p53、WT1、TNFR-Fc、ネコインターフェロン等をモデルタンパク質として、Tg カイコでの発現系を構築し、発現量増加、発現安定性、個体選別法、バンク化等、組換えタンパク質の製造と品質評価・管理手法の検討を行った。

Tg バンクの作製・管理手法では、ニュートラルレッドを含む人工色素を用いて卵巣を染色する方法により卵巣採取の効率化を図った。また、紐体と共に卵巣を採取し、再移植の際にレシピエントの紐体と絡めることで、移植後の産卵効率の向上を図った。今年度からは大型液体窒素タンクを用いた Tg バンクの本格的な運用試験を開始した。

## B.3 血中薬物濃度分析

### B.3.1 試薬類

共同研究では、共通した抗体医薬品(ヒト IgG1)、マウス血清(6種類)、TPCK 処理トリプシン、及び内標準物質(SIL-IS)を使用した。

### B.3.2 共同研究内容

抗体添加マウス血清を試料として、各機関で前処理及び液体クロマトグラフィー/質量分析(LCMS)による測定方法の最適化、ならびに、「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーション

に関するガイドライン」に従ったバリデーションを行った。

### B.3.3 安定同位体標識 Fab 発現系の作製

ある抗体医薬品の Fab 領域をモデルとし、安定同位体標識 Fab (SIL-Fab) 発現系を構築した。

## B.4 抗薬物抗体分析

### B.4.1 試料

モデル ADA として、ヒト血清に抗 B-mAb ポリクローナル抗体、抗 EPO モノクローナル抗体 BM802、あるいは、抗 EPO ポリクローナル抗体 LS-C11323 を添加した試料を 4 機関で共通に用いた。

### B.4.2 抗薬物抗体分析法

共通試料 3 種および個別試料を用いた ADA 分析法を各機関で構築した。用いられた分析法は、LOCI (luminescent oxygen channeling assay) 法 (AlphaLISA) が 1 機関、及び、ECL (electrochemiluminescence) 法が 3 機関であった。また、Drug tolerance 改善のための試料の前処理法や反応条件を検討し、薬物共存下での ADA 分析を実施した。ADA 濃度は、各機関での予備検討の結果をもとに高濃度 (H)、中濃度 (M)、低濃度 (L) の 3 種類とし、統一した条件を設定し、抗 B-mAb 抗体では、5, 0.5, 0.05µg/ml、抗 EPO 抗体では、0.5, 0.25, 0.05µg/ml を基準とした。

カットポイント (CP) は、個体別ブランク血清を用いた CP 設定は行わずに、陰性対照 (n=6) の平均値に 1.329\* を乗じて求めた仮カットポイント (仮 CP) を使用した。(\*: 背景値 (個体別ブランク血清) の相対標準偏差を 20% と仮定し、t 分布表の母集団無限大における臨界値を用いた 95% 信頼区間上限値として設定した。)

共存薬物濃度の範囲は、レスポンスが仮 CP をまたぐように設定し、共存薬物濃度は、抗 B-mAb 抗体分析系では、0.0001~100µg/ml、抗 EPO 抗体分析系では、0.001~10µg/ml を基準範囲とした。

### B.4.3 抗 EPO 抗体国際標準品の共同検定参加

WHOより配布された抗EPOヒトモノクローナル抗体10種類について、SPR法、及び、LOCI法により、レスポンスがカットポイント以上、及び、カットポイント以下となる境界の希釈倍数を測定した。

## B.5. 臨床安全性

PMDAが公開している医薬品副作用データベース(JADER)を用いて、医薬品一般名にマブ(抗体医薬品のステム)あるいはセプト(受容体のステム)、副作用名にinfusionまたは心不全・穿孔を入力して症例を検索した。投与開始日と有害事象の初回発現日が記載されているものを解析症例として、これらより発現時期を算出した。発現時期の有意差判定はSPSS 14.0のMann-Whitney検定で行い、箱ひげ図も参照した。また、infusion reactionについてはJADERの全報告数225,722件を母集団として、シグナル検出指標のReporting Odds Ratio(ROR)を算出した。RORの計算には、独自に構築した有害事象解析システムを使用した。

## B.6. ウイルス安全性

### B.6.1 CHO細胞内在性レトロウイルス遺伝子の解析

公開データベースから、チャイニーズハムスターのトランスクリプトームデータ、及び、CHO細胞のゲノムデータをダウンロードした。レトロウイルスgag遺伝子由来150nt配列をqueryとして、CHO細胞のトランスクリプトームデータベースから、gagのORFが保存されている内在性レトロウイルスgag遺伝子の候補を検索した。得られた配列をもとに、チャイニーズハムスターゲノムに対してBLASTを用いた検索を行い、CHO細胞内在性レトロウイルスをコードする遺伝子を同定した。

### B.6.2 Q-PCRによるウイルスクリアランス試験

B19ウイルス粒子は、B19陽性血漿の超遠心分離による沈殿をフィブリノゲン製剤の工程中間品(ウイルス除去膜工程前液)で再懸濁して調製した。B19遊離ゲノムはB19陽性血漿から抽出し調製した。B19ビリオン又は遊離ゲノムに対し50~0.08 U/mL

のDNase I又は10~0.016 U/mLのMicrococcal Nucleaseを10~60分間反応させた。反応停止後ゲノム抽出を行い、TaqMan PCRによる増幅サイズ988 bpのQ-PCR(以下988 bp Q-PCR)によりB19ゲノムを定量した。

<倫理面への配慮>

倫理面での配慮を必要とする試薬等は用いていない。

## C.結果

### C.1.品質

#### C.1.1 O結合型糖鎖試験法の開発と標準化

これまでに、単糖分析、中性オリゴ糖及び酸性オリゴ糖分析の標準的な試験法について検討を行い、平成26年3月に日本薬局方糖鎖試験法案の提案を行った。しかしながら、O結合型糖鎖修飾の解析に関しては、遊離に適した酵素がなく、アルカリβ脱離に基づく遊離法が用いられるが、その遊離効率にはアミノ酸配列及び糖鎖構造により影響を受けること、遊離糖鎖が還元末端から順次分解(ピーリング反応)すること、シアル酸の脱離など的人為的な変化が生じる恐れがあるなどの課題があり、糖鎖標準的な試験方法が明確でない。そこで、O結合型糖鎖分析及び糖ペプチド分析に関して、試験法設定において留意すべき事項を明らかにし、分析法の標準化を行うことを目的にした検討を行った。

#### (1)非還元的アルカリβ脱離

アバタセプトおよびウシフェツインよりカルバミン酸アンモニウムを用いた非還元的アルカリβ脱離にてO結合型糖鎖を遊離させ、2-AB誘導体化及びHILIC/FL分析を行った(図1A及びB)。ピーリング反応による副生成物は、\*印で示した位置に検出されたが、非常に低く抑えられていた。

#### (2)還元的アルカリβ脱離

遊離した糖鎖をMALDI-TOFMSを用いて測定したとき、組成がNeuAc<sub>2</sub>Hex<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>に相当するアルジトール型のO結合型糖鎖のNa<sup>+</sup>付加分子が、

$m/z$ 408.26, 699.38 及び 990.44 に観測された (図 2 挿入図). 遊離反応時の温度及び時間によるアルジトール型シアロ O-結合型糖鎖のシグナル強度の変化を図 2 に示す.  $80^{\circ}\text{C}$  で 1 時間程度の反応あるいは  $40^{\circ}\text{C}$  から  $60^{\circ}\text{C}$  で 4 時間程度の反応が適していると考えられた.

### (3)PMP 誘導体化

アルカリ $\beta$ -脱離と同時に PMP 誘導体化を行い, MALDI-TOFMS で測定したところ, 2 分子の PMP(その内 1 分子からは CH<sub>2</sub> が脱離)が結合した中性およびシアロ O-結合型糖鎖が Na<sup>+</sup>付加分子として  $m/z$ 736.49, 1027.27 及び 1318.18 に検出された. また, ピーリング反応による副生成物と思われる Na<sup>+</sup>付加分子( $m/z$ 824.32)も検出された.

### C.1.2 凝集体評価法の開発と標準化

注射剤に含まれる分子サイズ  $10\mu\text{m}$  以上の凝集体は, 日局<6.07>不溶性微粒子試験に測定され, 数十 nm 以下の凝集体は, 通例, サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により評価されるが, この間の粒子径の凝集体の評価方法は明確になっていない. また, SEC において, 凝集体がカラム担体に吸着して溶出されない, あるいは, 回収率が低下する, 分析中に凝集体が解離する恐れがある, などの課題がある. その他, タンパク質医薬品の<6.07>不溶性微粒子試験の適用について, 低容量化が求められている. そこで, 凝集体の特性毎に適した評価手法の開発と標準化, 及び, 不溶性微粒子試験の低容量化のための検討を行った.

#### C.1.2.1 凝集体評価法の分析能の比較

##### (1)光遮蔽 (LO)

光遮蔽法では, 測定結果は粒子径と計数值として得られる. そこで, 標準粒子を真球として, 粒子径とポリスチレンの密度から, 粒子数の推定値 (個/mL) を求め, 測定値と比較した (表 3). なお,  $2\mu\text{m}$ ,  $5\mu\text{m}$ ,  $10\mu\text{m}$  の粒子は,  $10\mu\text{g/mL}$  においてそれぞれ約  $2.3\times 10^6$ ,  $1.5\times 10^6$ ,  $1.8\times 10^4$  個/mL の粒子濃度となる.

$10\mu\text{m}$  の粒子では, いずれの機関も  $0.25\mu\text{g/mL}$ ~ $5\mu\text{g/mL}$  までの間で, 推定の粒子数と測定値との差は 20%以内であった. 低濃度での誤差の原因は, 標準粒子の量が少なくなることから ( $0.1\mu\text{g/mL}$  時の推定値は約 175 個/mL), バックグラウンドで混入した粒子の影響が無視できなくなった結果と考えられる.  $5\sim 10\mu\text{g/mL}$  では, 頭打ちの傾向が認められた.  $0.1\sim 5\mu\text{g/mL}$  の回帰直線の決定係数は, いずれの機関も 0.997 以上であった.

$5\mu\text{m}$  の粒子では, 一機関を除き  $0.1\mu\text{g/mL}$ ~ $1.0\mu\text{g/mL}$  までの間で, 推定の粒子数と測定値との差は 20%以内であり, この濃度での回帰直線の決定係数は, 0.998 以上であった.  $1.0\mu\text{g/mL}$  (約 14000 個/mL) 以上の濃度で頭打ちの傾向が認められた.

$2\mu\text{m}$  の粒子では, 粒子数が多すぎることから ( $0.5\mu\text{g/mL}$  で 110,000 個/mL) 正しく計測できなかった. 適切な粒子数範囲で再検討する必要がある.

なお, 粒子径分布は, 低濃度では一定であったが, 粒子濃度 (個/mL) が装置の測定可能な上限に近づくると分布に異常が認められた (表 3 の参考図).

##### (2) フローイメージング (FI)

$10\mu\text{m}$  の粒子では,  $0.5\mu\text{g/mL}$  以上で一部のデータを除き推定の粒子数と測定値との差は 20%以内であった.  $0.01\sim 10\mu\text{g/mL}$  の回帰直線の決定係数は, いずれの機関も 0.996 以上であった (表 4).

$5\mu\text{m}$  の粒子では, 一機関を除き  $0.1\mu\text{g/mL}$ ~ $10.0\mu\text{g/mL}$  までの間で, 推定の粒子数と測定値との差は 20%以内であった. この濃度での回帰直線の決定係数は, 全ての機関で 0.996 以上であった.

$2\mu\text{m}$  の粒子では,  $10.0\mu\text{g/mL}$  で機器の計測数の上限に達してしまうことがあった. 2機関で,  $0.5\mu\text{g/mL}$ ~ $10.0\mu\text{g/mL}$  までの間で, 推定の粒子数と測定値との差は 20%以内であった. 1機関で  $0.5\mu\text{g/mL}$  で著しく低い測定値になった点を除くと, 測定した範囲での回帰直線の決定係数は, 全ての機関で 0.995 以上であった.

1機関では全体的に測定値が大きく出る傾向があった. この原因として, FI では標準粒子以外のバックグラウンドで  $1\sim 2\mu\text{m}$  の微粒子が観測されてい

たが、この機関において特に多く観測されたことが原因かもしれない。

なお、粒子径分布は、濃度によらず一定であった（表4の参考図）。

### (3) レーザー回折 (LD)

レーザー回折は、約100nm～数mmの幅広い粒子に対して粒子径とその分布を与える装置であるが、通常、定量的な装置ではない。今回タンパク質凝集体評価を目的として開発された定量可能なレーザー回折装置を使用した。

10 $\mu$ m及び5 $\mu$ mの粒子では、10 $\mu$ g/mLでは試料濃度が薄すぎて計測に不適であった（表5）。

2 $\mu$ mの粒子では、全体的に測定濃度がやや小さな値となる傾向があったが、5 $\mu$ g/mL～100 $\mu$ g/mLで、推定値の80～90%の計測値が得られ、この範囲での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.992以上であった。

1 $\mu$ mのシリカ粒子では、5 $\mu$ g/mL～50 $\mu$ g/mLで、推定値と測定値との差は20%以内であり、この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.997以上であった。

500及び900nmの粒子では、1～25 $\mu$ g/mLで推定値と測定値との差は20%以内であり、この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.997以上であった。

220nmの粒子では、2.5～50 $\mu$ g/mLで測定が可能であったが、1機関では推定値と測定値との差は20%を超えることがあった、この濃度での回帰直線の決定係数は、全ての機関で0.995以上であった。

### (4) 動的光散乱 (DLS)

動的光散乱は、粒子径及び粒子径分布を得る方法であり、定量的な方法ではない。凝集体評価法としては、タンパク質単量体のシグナルと、凝集体の粒子径及びシグナルを比較することが考えられる。そこで、標準粒子を用いて、粒子を検出可能な濃度及び得られる粒子径の精度について検討した（表6）。なお、DLSでは流体力学径が得られるので、標準粒子の粒子径とは異なった値となる。

2 $\mu$ mの粒子では、今回検討した濃度（最大10 $\mu$ g/mL）では、粒子径のばらつきや誤差が大きかった。散乱光の変動から得られた自己相関関数の質が低く、正しく分布解析できなかつたと考えられる。分析時間を延長するなどの方法が考えられるが、大幅な延長は現実的ではないと思われる。

900nmのポリスチレン粒子及び1 $\mu$ mのシリカ粒子でも、2 $\mu$ mの粒子と同様な傾向が見られた。機関間、装置間、分析条件間での違いが大きく、分析条件の最適化とともに、凝集体評価法として、この粒子径において利用可能な議論が必要である。

500nmの粒子では、0.5または1.0 $\mu$ g/mL以上で、標準粒子の認証値の20%以内で粒子径が測定された。この時の多分散性指数 (PdI) は0.4以内であった。

220nmの粒子では、0.25または0.05 $\mu$ g/mL以上で、標準粒子の認証値の20%以内で粒子径が測定された。この時、ほとんどの場合、PdIは0.1以内であった。

60nmの粒子では、一機関を除き、0.25、0.5または10 $\mu$ g/mL以上で、標準粒子の認証値の20%以内で粒子径が測定された。この時、ほとんどの場合、多分散性指数 (PdI) は0.1以内であった。

### (5) ナノトラッキング解析 (NTA)

3回の測定結果の%RSDが10%以下、計算値と測定値の差が20%以内、決定係数が0.99以上、の全てを満たす結果は得られなかった。

### (6) 共振型質量測定装置 (RMM)

2 $\mu$ mの粒子では、1 $\times 10^5$ ～1 $\times 10^7$ 個/mL（約0.044～4.4 $\mu$ g/mL）で、900nmの粒子では、1 $\times 10^7$ 個/mL（約0.4 $\mu$ g/mL）で、推定値と測定値の差が20%以内であった。

### C.1.2.2 注射剤の不溶性微粒子試験法の低容量化

表7に、各種濃度の10 $\mu$ mの標準粒子を低容量化して分析した時のばらつきの変化を示す (n=3)。通常の容量 (5mL) と較べて、1mLまたは0.2mLで測定した場合には、相対標準偏差は約2～3倍に